

JP00/4837

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

WIPO  
REC'D 12 SEP 2000  
PCT

190700  
PCT/JP00/04837

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

出願番号  
Application Number:

出願人  
Applicant(s):

1999年 7月21日

平成11年特許願第206320号

小関 良宏  
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特200

特許願	1519JP	提出日	平成11年 7月21日	特許庁長官殿	C12N 15/09	A01H 5/00	C12N 5/14	【発明者】	【住所又は居所】	【氏名】	【発明者】	【住所又は居所】	大阪府豊中市三和町1丁目1番11号 三栄源エフ・エフ・アール株式会社内	香田 隆俊	【特許出願人】	【住所又は居所】	東京都東久留米市大門町2-3-6-302	小関 良宏	【氏名】	【特許出願人】	【住所又は居所】	東京都東久留米市大門町2-3-6-302	小関 良宏	【特許出願人】	000175283	三栄源エフ・エフ・アール株式会社	【代理人】	100065215	【識別番号】	【弁理士】	【氏名又は名称】	三枝 英二	【電話番号】	06-6203-0941
-----	--------	-----	-------------	--------	------------	-----------	-----------	-------	----------	------	-------	----------	-------------------------------------	-------	---------	----------	----------------------	-------	------	---------	----------	----------------------	-------	---------	-----------	------------------	-------	-----------	--------	-------	----------	-------	--------	--------------

【選任した代理人】  
【識別番号】 100076510  
【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路  
【選任した代理人】

【識別番号】 100086427  
【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志  
【選任した代理人】

【識別番号】 100090066  
【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司  
【選任した代理人】

【識別番号】 100094101  
【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光  
【選任した代理人】

【識別番号】 100099988  
【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治  
【選任した代理人】

【識別番号】 100105821  
【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳  
【選任した代理人】

【識別番号】 100099911  
【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】	100108084	【識別番号】	【弁理士】	【氏名又は名称】	中野 睦子	【手数料の表示】	001616	【予納台帳番号】	21,000円	【提出物件の目録】	【物件名】	明細書	1	【物件名】	図面	1	【物件名】	要約書	1	【包括委任状番号】	9708179	【フロップの要否】	要
-----------	-----------	--------	-------	----------	-------	----------	--------	----------	---------	-----------	-------	-----	---	-------	----	---	-------	-----	---	-----------	---------	-----------	---



【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジーンサイレンシング抑制因子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1以上の可動性因子を含むことを特徴とするジーンサイレンシング抑制因子。

【請求項2】 可動性因子がMITE様因子である請求項1記載のジーンサイレンシング抑制因子。

【請求項3】 可動性因子が、下記 (a) 又は (b) のDNAからなるMITE様因子：

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA  
(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において (A) n G (A) n [nは1以上の整数]の重複を引き起こすMITE様因子をコードするDNA、又は

下記 (c) 又は (d) のDNAからなるMITE様因子：  
(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA  
(d) (c)の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位においてTAの重複を引き起こすMITE様因子をコードするDNA

【請求項4】 可動性因子が、下記 (a) 又は (b) のDNAからなるMITE様因子：

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA  
(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において (A) n G (A) n [nは1以上の整数]の重複を引き起こすMITE様因子をコードするDNAと、

下記 (c) 又は (d) のDNAからなるMITE様因子：  
(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA

(d) (c)の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位においてTAの重複を引き起こすMITE様因子をコード

する DNA

とのタンパク結合体である請求項 2 記載のジーンサイレンシング抑制因子。

【請求項 5】配列番号 3 記載の塩基配列を有する DNA からなるジーンサイ

レンシング抑制因子。

【請求項 6】請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のジーンサイレンシング抑制

因子、並びに該因子に作動可能に結合した DNA 配列を含む、植物における導入

遺伝子発現用カセット。

【請求項 7】ジーンサイレンシング抑制因子に作動可能に結合した DNA 配

列がプロモーター及び／又はターミネーターである請求項 6 記載の導入遺伝子発

現用カセット。

【請求項 8】ジーンサイレンシング抑制因子に作動可能に結合した DNA 配

列として、更に発現させる所望の導入遺伝子配列を含む請求項 7 記載の導入遺伝

子発現用カセット。

【請求項 9】請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のジーンサイレンシング抑制

因子を含むプラスミド。

【請求項 10】請求項 6 乃至 8 のいずれかに記載の導入遺伝子発現用カセッ

トを含むプラスミド。

【請求項 11】請求項 6 乃至 8 のいずれかに記載の導入遺伝子発現用カセッ

トを含むトランスジェニック植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はジーン・サイレンシング等による遺伝子発現の不活性化を抑制する（

遺伝）因子に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子操作において、従来、高等生物への遺伝子の導入のほとんどは、原核生

物におけるプラスミドに相当するものがないため、核ゲノム挿入型の遺伝子導入

である。

【0003】

かかる核ゲノム挿入型の遺伝子導入には、挿入する所望の遺伝子を結合したベクターを、パーチクル・ガン法、リポフエクション法及びエレクトロポレーション法などによって高等生物の核ゲノムに導入する物理的方法と、前記ベクターをウイルス又は微生物に一旦導入して、そのウイルスもしくは微生物が有しているDNA移送・挿入系を利用して高等生物の核ゲノムに導入する生物的方法とがある。

【0004】

しかし、これら物理的方法及び生物的方法はいずれも、高等生物に挿入された遺伝子の発現活性が個体ごとにより一定しないという問題がある。この原因の多くは、位置効果 (position effect) によるサイレンシングである (Peachら, Plant. Mol. Biol, 17 : 46-60 (1991))。かかる位置効果は酵母を始めとする多くの真核生物に見られる現象であり、挿入された遺伝子そのものの塩基配列は全く変わっていないにもかかわらず、その遺伝子が染色体上のどの位置に挿入されるかによってその発現活性が大きく変わってしまう、場合によってはその遺伝子の発現が不活性化 (ジーン・サイレンシング) されてしまう現象である (細胞の分子生物学, Molecular Biology of the Cell, 第3版, 434-435 (1995))

【0005】

かかるジーン・サイレンシング現象に基づいて、高等生物における核ゲノム中の遺伝子はすべてが均一に転写されるわけではないこと、活発に転写されている遺伝子領域 (活性化領域 (active site)) と全く転写されていない遺伝子領域 (不活性化領域 (cryptic site)) とが混在していることが見いだされた。不活性化領域に挿入された遺伝子は、転写に必要とされるタンパク質が全くプロローチできないため転写が起らず、遺伝子発現の不活性化 (ジーン・サイレンシング) が起こっている。また、この領域においてはゲノムDNAのメチル化、ヌクレオソーム構造の強化のために全く転写が起らない。

【0006】

また、このジーン・サイレンシングは、X染色体に見られるように、同一生物

体の中でも細胞の分化状態によって異なることが知られている。さらに、現在のところ未解明の機構によってジーン・サイレンシングが生じると、それはその個体でのみならず、交配によって生じた次世代の子孫にまで伝達されてジーン・サイレンシングが伝達することが知られている（細胞の分子生物学, Molecular Biology of the Cell, 第3版, 434-453 (1995)）。

【0007】

ところで、遺伝子操作において、ジーン・ノックアウト法で用いられる相同組み換え法を除いて、所望の遺伝子を物理的方法もしくは生物的方法のいずれかの方法で高等生物細胞に導入した場合、その遺伝子が細胞の核ゲノムの領域に挿入されるかは細胞ごとに全く異なり、またそれを人為的にそれを制御することはほぼ不可能である。このため、外来遺伝子を高等生物細胞に導入すると、外来遺伝子を核ゲノムの活性化領域に含む細胞と不活性化領域に含む細胞とが不確定に形成されることになる。

【0008】

不活性化領域に外来遺伝子が挿入されると、その近傍の遺伝子領域の不活性化場の影響を受けるために、外来遺伝子の発現が著しく低下・消失してしまうことが知られており、また活性化領域に外来遺伝子が挿入された場合においてもジーン・サイレンシングによって外来遺伝子の発現が細胞分裂を繰り返して生長が進むにつれ不安定化し、低下していくことが知られている（Peach ら, Plant Mol. Biol, 17 : 46-60 (1991)）。

【0009】

不活性になる原因として主として考えられているのは、核DNAの染色体内での構造である。その核DNAの構造に関与している因子としては、MAR (matrix attachment region, SAR (scaffold attachment region) とも呼ばれる) 配列がある。これは核ゲノムDNAを核マトリクスにアンカーする配列として見い出されたものである。動物において、MARを含む二コトりのAエレメント挿入したい外来遺伝子に結合して遺伝子導入した時、導入した遺伝子の発現が上昇することが示された (Stief ら, Nature 341 : 343-345 (1989)) が、しかしその後の研究 (Bonifer ら, Nucleic Acids Res. 22:4202-4210 (1994), Poljak ら



, Nucleic Acids Res.22:4386-4394 (1994)) によって、MA Rは遺伝子の発現効率の上昇に寄与するが、それ単独では位置効果を打ち消さないことが明らかにった。植物においても、形質転換体を用いたMA Rの効果調べる研究が行われているが、再現性のある結果は得られておらず、MA R単独では位置効果を打ち消すことができるとは考えられていない(飯, 植物のゲノムサイエンス 153-160 (1996))。

【0010】

現在、遺伝子組み換え食品として遺伝子組み換え植物が開発されている。しかし、そこで克服すべき最も重要な問題は、前述するように、外来遺伝子の発現不活性化をもたらすジーン・サイレンシング現象である。遺伝子組み換え植物が開発においては、ジーン・サイレンシング現象を回避するために、非常に数多くの植物個体の中からジーン・サイレンシングをなるべく引き起こさない位置に外来遺伝子が挿入された植物個体を選抜すること、さらに長年にわたって交配を繰り返してもジーン・サイレンシングを起らない植物個体を選抜することが必要とされている。しかしかかる選抜には、数多くの植物個体を育てるという土壌面積上の問題、並びに何代もの交配を重ねる労力と時間が必要であるという問題がある。

【0011】

このため、ジーン・サイレンシングを回避する他の戦略として、ジーン・サイレンシングを抑制すること、具体的にはジーン・サイレンシングを抑制する因子を開発することが、植物の遺伝子組み換えにおいて最も重要かつ早急な課題となっている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ジーン・サイレンシングという遺伝子不活性化現象を抑制する因子を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者は上記課題を解決すべく日夜鋭意研究を重ねていたところ、可動性因

子を用いて、これを植物の遺伝子組み換え用ベクターに組み込むことによって、導入した外来遺伝子のジーン・サイレンシング現象が有意に抑制できることを見出し、これらが外来遺伝子の発現用カセットとして極めて有用であることを確信した。本発明は、かかる知見に基づくものである。

【0014】

すなわち、本発明は下記項 1〜5 に掲げるジーンサイレンシング抑制因子であ

る：

- 項 1. 1 以上の可動性因子を含むことを特徴とするジーンサイレンシング抑制因子。
- 項 2. 可動性因子が M I T E 様因子である請求項 1 記載のジーンサイレンシング抑制因子。
- 項 3. 可動性因子が、下記 (a) 又は (b) の DNA からなる M I T E 様因子：

- (a) 配列番号 1 の塩基配列からなる DNA
- (b) (a) の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において (A) n G (A) n [n は 1 以上の整数] の重複を引き起こす M I T E 様因子をコードする DNA、及び/又は
- 下記 (c) 又は (d) の DNA からなる M I T E 様因子：
- (c) 配列番号 2 の塩基配列からなる DNA
- (d) (c) の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において T A の重複を引き起こす M I T E 様因子をコードする DNA

である、項 2 記載のジーンサイレンシング抑制因子。

項 4. 可動性因子が、下記 (a) 又は (b) の DNA からなる M I T E 様因子：

- (a) 配列番号 1 の塩基配列からなる DNA
- (b) (a) の塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において (A) n G (A) n [n は 1 以上の整数] の重複を引き起こす M I T E 様因子をコードする DNA、及び
- 下記 (c) 又は (d) の DNA からなる M I T E 様因子：
- (c) 配列番号 2 の塩基配列からなる DNA

(d) (c) の塩基配列からなる DNA と ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ挿入部位において T A の重複を引き起こす M I T E 様因子をコードする DNA

の タンデム 結合体である項 2 記載の ジーン サイレンシング 抑制因子。  
項 5. 配列番号 3 記載の塩基配列を有する DNA からなる ジーン サイレンシング 抑制因子。

【0015】

また、本発明は上記に掲げる ジーン サイレンシング 抑制因子を含有する導入遺伝子発現用カセットである。具体的には下記項 6～8 に掲げるカセットを挙げる  
ことができる：

項 6. 項 1 乃至 5 のいずれかに記載の ジーン サイレンシング 抑制因子、並びに該因子に作動可能に結合した DNA 配列を含む、植物における導入遺伝子発現用カセット。

項 7. ジーン サイレンシング 抑制因子に作動可能に結合した DNA 配列がプロモーター及び/又はターミネーターである項 6 記載の導入遺伝子発現用カセット。

項 8. ジーン サイレンシング 抑制因子に作動可能に結合した DNA 配列として、更に発現させる所望の導入遺伝子配列を含む項 7 記載の導入遺伝子発現用カセット。

ト。

【0016】

さらに本発明は、上記に掲げられる ジーン サイレンシング 抑制因子 (例えば導入遺伝子発現用カセットとして) を含むプラスミドであり、さらにはかかるプラスミドを利用して ジーン サイレンシング 抑制因子が導入されたトランスジェニック植物に関するものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、特に植物体において生じる ジーン サイレンシング による導入遺伝子の発現不活性化を抑制する効果を有する、 ジーン サイレンシング 抑制因子に関する。

【0018】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子は、1以上の可動性因子を含むことを特徴とする。

【0019】

可動性因子は、大きくDNA型（トランスポゾンおよび挿入配列）、RNA型（レトロトランスポゾン）（Bergら編集, Mobile DNA (1989)）、並びにこれらのいずれにも属さないもの、すなわちminiature-inverted repeat transposable element (MITE) (Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 914-821 (1995)) の3種類に大別される。

【0020】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子には、可動性因子としてこれらの少なくとも1種を、同一若しくは異なつて、1以上含有するものがいずれも包含されるが、とりわけ可動性因子としてMITEを含有することが好ましい。

【0021】

MITEは、Bureauらによって1992年に初めてTourist属として見い出された可動性因子であり (Bureauら, Plant Cell 4: 1283-1294 (1992))、それ以来、植物、昆虫並びに動物のゲノムからも各種のMITEが見い出されている。一般にMITEは、(1) その5'末端及び3'末端の両端に完全もしくは不完全な逆反復配列を有する（この点でDNA型可動性因子と類似する。）、(2) その逆反復配列の両末端側に、DNA型可動性因子がゲノムDNAに挿入される際に生じるのと同様に、2塩基対以上の同方向反復配列を有する標的重复配列様の配列が見い出される、及び(3) 大きさが一般的に2kb以下である、といった特徴を有するものとして定義される (Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5 : 914-821 (1995))。

【0022】

本発明においては、かかる定義の範疇に属するいずれのMITEを用いることができる。

【0023】

中でも好適なMITEとしては、ゲノム遺伝子の挿入部位に (A) n G (A) n の重複をもたらし、可動性因子を挙げる（以下、

かかるMITFを便宜上「IS2因子」とも称する。）。  
【0024】

ここでnは1以上の整数であればよく、特に制限されないが、具体的には2～6、好ましくは3～5、より好ましくは4を挙げることができる。かかるIS2因子は、より具体的には、大きさが2kb程度以下、好ましくは0.2～2kb程度のDNAであり、その5'末端及び3'末端に互いに逆向きの反復配列(末端逆反復配列)を有するものである。  
【0025】

またIS2因子は、他の構造的な特徴として、その塩基配列中に式(1)：  
Xt t g c a a Y (式中、Xはg又はtを、Yはa又はcを示す) (配列番号4～7)、または式(2)：  
Z a t g c a a (式中、Zはt又はaを示す) (配列番号8～9)

で示される塩基配列の少なくとも1つを、連続又は非連続に反復して含有するものである。かかる反復配列の位置及びその数は特に制限はなく、IS2因子の両末端域に位置する末端逆反復配列中、または該末端逆反復配列間に挟まれた中間領域中に含まれていても良い。  
【0026】

かかるIS2因子として具体的には、図1に示すように、上記式(1)及び式(2)で示される反復配列を複数、末端逆反復配列間の中央領域中に含み、また式(1)で示される反復配列を複数、末端逆反復配列中に含む構造を有するものを挙げることができる。  
【0027】

またIS2因子が有する末端逆反復配列は、両者が互いに厳格に相補的な配列である必要はなく、5'末端領域と3'末端領域とがストリントな条件で互いにハイブリダイズし、その結果、IS2因子が図1に示すようにヌテム構造となるものであれば足りる。この意味でIS2因子は、末端逆反復配列として完全のみならず不完全な逆反復配列を有するものを包含するものである。  
【0028】

本発明で用いられる具体的なIS2因子としては、末端逆反復配列として、5

、末端領域に配列番号 10 の塩基配列を有し、また 3' 末端領域に配列番号 11 の塩基配列を有するものを例示することができる。IS2 因子としてより具体的には、配列番号 1 で示す塩基配列を有するものである。なお、IS2 因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能的同等物であるかぎり、末端逆反復配列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中央領域に位置する配列において、1 つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明で用いられる MITE 様因子はかかる機能的同等物を包含するものである。

#### 【0029】

好ましい機能的同等物としては、配列番号 1 の塩基配列を有する MITE (IS2 因子) の機能または活性を実質的に有し、挿入部位において (A) n G (A) n [n は 1 以上の整数] の重複を引き起こし、かつ上記 IS2 因子 (配列番号 1) とヌクレオチドな条件でハイブリダイズするものを挙げるることができる。尚、ヌクレオチドな条件としては、1×SSC、0.1%w/w SDS 中、50℃以上で 1 時間の条件を挙げるることができる。より具体的には、機能的同等物として、上記機能を有するとともに、配列番号 1 で示される IS2 因子と比べた場合に、塩基配列において 70%以上、好ましくは 85%以上、より好ましくは 90%以上、更に好ましくは 95%以上のホモロジーを有するものを挙げるることができる。

#### 【0030】

また、他の好適な MITE としては、ゲノム遺伝子の挿入部位に TA の重複をもたらし、かつ末端逆反復配列として 5' 末端領域に配列番号 12 の塩基配列を、また 3' 末端領域に配列番号 13 の塩基配列を有することを特徴とする可動性因子を挙げることもできる (以下、かかる MITE を「IS1 因子」という)。( )。かかる IS1 因子としては、具体的には大きさが 1 kb 程度以下、好ましくは 100 bp ~ 500 bp 程度の DNA を挙げることもできる。

#### 【0031】

IS1 因子として具体的には、図 2 に示す構造を有するものを例示することができる。より具体的には配列番号 2 で示される塩基配列を有するものが例示できる。なお、IS1 因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能的同

等物であるかぎり、末端逆反復配列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中央領域に位置する配列において、1つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明で用いるMITE様因子はかかる機能的同等物を包含するものである。

【0032】

好ましい機能的同等物としては、配列番号2の塩基配列を有するIS1因子の機能または活性を実質的に有し、挿入部位においてTAの重複を引き起こし、かつ上記IS1因子（配列番号2）とストリンジエントな条件でハイブリダイズするものを挙げることができる。尚、ストリンジエントな条件としては、前述するものに、1×SSC、0.1%w/w SDS中、50℃以上で1時間の条件を挙げることができる。より具体的には、機能的同等物として、上記機能を有するとともに、配列番号2で示されるIS1因子と比べた場合に、塩基配列において70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上のホモロジーを有するものを挙げることができる。

【0033】

これらのIS2因子及びIS1因子は、後述するようにニンジンのゲノム、具体的にはニンジンのフェニルアラニンアミノリナーゼ遺伝子から本発明者に与えられて新たに見出されたものであり、本明細書の記載に従って単離・取得することができる。

【0034】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子は、好適には、前述するIS2因子、IS1因子及びそれらの機能的同等物の少なくとも1つの塩基配列を含むものである。

【0035】

より具体的には、本発明のジーンサイレンシング抑制因子としては、①IS1因子又はその機能的同等物の塩基配列を有するもの、②IS2因子又はその機能的同等物の塩基配列を有するもの、③IS1因子若しくはその機能的同等物の塩基配列とIS2因子若しくはその機能的同等物の塩基配列をタヌテムに結合してなる塩基配列を有するもの（順不同）、④IS1因子（若しくはIS2因子）又

はその機能的同等物の塩基配列を任意の塩基配列を介して、IS2因子(若しくはIS1因子)又はその機能的同等物の塩基配列と結合してなる塩基配列を有するもの、などを例示することができる。ジーンサイレンシング抑制因子として、好ましくはIS1因子(若しくはIS2因子)又はその機能的同等物とIS2因子(若しくはIS1因子)又はその機能的同等物とのタンパク結合体であり、かかるものとして具体的には、配列番号3に記載する塩基配列を有するものを挙げることができる。なお、上記④に掲げるジーンサイレンシング抑制因子において、IS1因子とIS2因子(順不同)との間に位置する塩基配列は、本発明の効果を妨げない限り特に制限されず、任意の塩基配列を用いることができる。好ましくはニンジnPALプロモーター配列に由来するものを挙げることができる。また、かかる塩基配列は、通常5～1000bp、好ましくは300～500bpの塩基長を有することができる。かかるジーンサイレンシング抑制因子として、具体的には配列番号14に掲げる塩基配列を有するものを例示することができる。

## 【0036】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子は、植物体に導入する所望の遺伝子配列(導入遺伝子配列(外来遺伝子配列を含む))に作動可能に結合することができる。さらに該導入遺伝子配列を結合した該配列は、植物機能的プロモーターや植物機能的ターミネーター等のDNA配列に作動可能に結合することができる。

## 【0037】

なお、本発明において「作動可能に結合する」とは、ジーンサイレンシング抑制因子が、上記導入遺伝子配列または各種の機能的DNA配列に対して、挿入位置及び方向に係わらず、これらの配列に影響を及ぼし得るに十分な程度に該配列の近傍に位置することを意味する。

## 【0038】

本発明において、導入遺伝子としては植物中で発現が所望されるDNAを、該植物に対して同種若しくは異種の如何を問わず挙げることができる。かかる導入遺伝子には、例えばβ-グルクロニダーゼをコードする遺伝子;抗生物質耐性遺伝子;殺虫及び殺菌タンパク質毒素をコードする遺伝子;耐病原菌化合物;過敏



応答化合物、例えばペルオキシダーゼ、グルカナーゼ、及びキチナーゼ、並びに  
酵素（例えばタンパク質、ヌターチ、糖及び脂肪の含量又はその質に関連した酵  
素）を合成する遺伝子及びそれらの調節因子遺伝子；植物酵素阻害剤、例えばノ  
ロテア－ゼ及びアミラーゼ阻害剤に関する遺伝子；植物ホルモン合成に係わる遺  
伝子；昆虫ホルモン及びフエロモンの合成に係わる遺伝子；医薬及び栄養化合物  
、例えばβ-カロチンやビタミン合成に係わる遺伝子；並びに植物中に存在する  
ヌクレオチド配列に干渉するアプタゼン転写物質が含まれるが、それらに何ら  
限定されるものではない（TRANSGENIC PLANT, 第1巻, Academic Press 1993）

## 【0039】

また本発明は、前述するジーンサイレンシング抑制因子、並びにそれに作動可  
能に結合してなるDNA配列を含む、植物に適用するのに適した遺伝子発現用カ  
セットに関する。なお、本発明で遺伝子発現用カセットとは、植物に導入するた  
めに用いられるプラスミド並びにそのサブリグメントを意味する。

## 【0040】

ここでジーンサイレンシング抑制因子に作動可能に結合してなるDNA配列と  
しては、プロモーター又はターミネーター等の機能的DNA配列を挙げることが  
でき、さらに前述する導入遺伝子配列を含めることができる。

## 【0041】

ここでプロモーターとは、該プロモーターの下流に目的とするタンパク質の構  
造遺伝子を連結した場合、該タンパク質の植物細胞内における発現を制御する能  
力を有するDNA配列を包含するものであり、植物の形質転換のために当業界で  
用いられているあらゆる植物機能性プロモーターが含まれる。従来から植物の形  
質転換用に多数のプロモーターが用いられており、これらには例えばアグロバク  
トリウム・ツマファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) から単離されるプ  
ロモーターである、オクトピエンターゼ (ocs) プロモーター (L. Comai et al  
., 1985; C. Waldr n et al., 1985)、マソピエンターゼ (mas) プロモーター  
、及びノパリエンターゼ (nos) プロモーターが含まれる。また、カリフラワ

一モザイクウイルス (Cauliflower Mosaic Virus) 35Sプロモーターは、双子葉類の形質転換に汎用されているプロモーターであり、本発明においても好適に使用できる。また35Sプロモーターの改変物、例えば2つの並列35Sプロモーター (R.Kay et al., 1987) およびmas-35Sプロモーター (L.Comai et al., 1990) なども用いることができる。さらに、カリフラワーモザイクウイルス19Sプロモーター (J.Paszowski et al., 1984;) やゴマノハグサモザイクウイルス由来の34Sプロモーター (M.Sanger et al., 1990) をも含めることもできる。また、植物由来のプロモーターであるアクチン・プロモーター、リプロース-1,5-二リン酸カルボキシラゼ小サブユニット (rbcS) プロモーター等も例示できる。

#### 【0042】

またターミネーターとは、植物細胞内で目的の構造遺伝子を効率よく転写終結させる能力を有するDNA配列を包含するものであり、植物の形質転換のために当業界で用いられているあらゆる植物機能性ターミネーターが含まれる。具体的には、例えばノバリンシエンターゼ (nos) ターミネーターを代表的なものとして挙げる事ができる。

#### 【0043】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子、または該因子を含む本発明の導入遺伝子発現用カセットは、広く植物一般に対して、導入された遺伝子の該植物内の発現誘導もしくは発現調節に用いることができる。

#### 【0044】

植物としては、特に制限はされないが、特に農業上有用な植物を、単子葉植物と双子葉植物の別なく、挙げる事ができる。例えば単子葉類には、トウモロコシ、イネ、小麦、大麦、モロコシ、カラス麦、ライ麦、キビ等の穀物類作物、ユリ、ラン、アヤメ、ヤシ、チューリップ、スゲなどの各種観葉植物が含まれる。また双子葉類には、キンギョソウ、カーネーション、モクレン、ケシ、キヤベツ、バラ、エンドウ、ボインセチア、ワタ、サボテン、ニンジシ、コケモモ、ハツカ、ヒマウリ、トマト、ニレ、オーク、カエデ、ボナラ、ダイズ、メロシ、テンサイ、ナタネ、シヤガイモ、レタスなどが含まれる。

【0045】

さらに本発明は、本発明のジーンサイレンシング抑制因子、または該因子を含む本発明の導入遺伝子発現用カセットを含むことによって、導入された遺伝子のジーンサイレンシングによる不活性化が抑制されてなるトランスジェニック植物、またこれらの植物の子孫を対象とするものである。

【0046】

なお、ここで「植物」とは、完全な植物体のみならず、例えば葉、種子、球根、さし穂などの植物体の一部を包含する趣旨で用いられ、さらにはプロトプラスト、植物カルス及びミクログロブ増殖体などの植物細胞をも包含するものである。

【0047】

かかるトランスジェニック植物を作成する方法は、特に制限されず、当業界で慣用されている任意のDNA導入方法を使用することができる。具体的には、本発明のジーンサイレンシング抑制因子、または該因子を含む導入遺伝子発現用カセットを含む発現プラスミドを用いて植物細胞にDNAを導入する方法であり、例えば、アグロバクテリウム法、電氣的導入法（エレクトロポレーション）、パーティクルガン法などの公知の方法を挙げることができる。かくして得られる本発明のジーンサイレンシング抑制因子、該因子を含む導入遺伝子発現用カセット、または発現プラスミドを含有する植物細胞は、例えば、S.B.Gelvin, R.A.Schilperoot adn D.P.S.Verma著：プラント・モレキュラー・バイオロジィ・マニユアル（1988）やValvekens et al. Proc Natl. Acad. Sci., 85: 5536-5540 (1988)に記載される植物組織培養技術で用いられる通常の方法に準じて再生することにより、該植物細胞に由来する植物体またはその一部を得ることができる。

【0048】

なお、本発明の発現プラスミドは、植物細胞に導入する所望のDNA配列（例えば、ジーンサイレンシング抑制因子、導入遺伝子、プロモーター、ターミネーター等）を含むものであればよいが、かかるDNA配列が作動可能に結合されていることが好ましい。なお、ここで作動可能に結合しているとは、プラスミドが意図された目的のために作用することを意味する。具体的には、プラスミドが植物細胞内に導入された場合に、該プラスミドに含まれるプロモーターが不活性化

されることがなく、ジーンサイレンシング抑制因子の制御のもとで、所望の導入遺伝子（構造遺伝子）が発現され、またその発現がターミネーターの働きによって効率よく転写終結されることを包含する。

【0049】

また本発明は、植物中で導入遺伝子が発現させる方法を包含する。かかる方法は、少なくとも、導入遺伝子を組み込んだ導入遺伝子発現用カセットを植物に導入する工程、及び該植物において前記導入遺伝子が発現させる工程によって行うことができる。なお、植物への導入遺伝子発現用カセット（DNA）の導入並びに導入遺伝子の発現は、いずれも当業界における公知方法を用いて行うことができる。

【0050】

【発明の効果】

本発明のジーンサイレンシング抑制因子は、ジーン・サイレンシング等による導入遺伝子の不活性化を抑制する性質を有するものである。かかる性質を有する本発明のジーンサイレンシング抑制因子によれば、導入遺伝子の発現不活性化を解消することができる。さらに本発明の因子を単独もしくは核DNA構造に関与するMAR（matrix attachment region）といった他の因子と組み合わせて用いることによって、遺伝子組み換え植物体の作出において、導入遺伝子を安定的に発現させることが可能となると思われる。導入遺伝子が安定的に発現できるようになれば、所望の遺伝子を植物に導入した後に行われる、スクリーニングの回数および育種すべき組み換え植物体の数を顕著に減らすことが可能になる。また遺伝子組み換え植物体の製品や品種の安定性を確保することができる。

【0051】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はかかる実施例によって何ら限定されるものではない。なお、本発明で用いられる遺伝子工学的技術並びに分子生物学の実験操作（制限酵素処理条件、ライゲーション反応条件、大腸菌へのトランスフォーマーシヨン方法等）は、一般に広く用いられている方法、例えばJ., Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis著、モレキュラークロ

ーニツグ第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド・スプリング・ハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory press) 発行、1989年及びD. M. Glover著、DNAクローニツグ、IRL発行、1985年などに記載されている方法に従って行うことができる。

# 実施例 1

## 1) 標的植物、標的遺伝子

MITE様因子の探索にあたり、標的植物としてニツジンをを用いた。具体的には、ニツジン (*Daucus carota* L. cv. *Kurodagosun*) のフェニルアラニンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子を用いた。

## 2) ニツジンPAL遺伝子 gDCPAL3および gDCPAL4のクローニツグ

ニツジン核DNAライブラリーから、ニツジン核遺伝子をクローニツグした。なお、ニツジン核DNAライブラリーは、本発明者の先行文献 (Ozeki et al. (1993)) の記載に従って、ニツジン培養細胞 (Ozeki and Komamine (1981)) からEMBL3 ベクターを用いて作成した。

## 【0052】

具体的には、ニツジンの核DNAを、Murray and Thompson (1980) の方法に従って、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) 溶液を用いて凍結乾燥したニツジンから調製した。得られた核DNAを *Sau3A*I で部分消化し、シヨ糖濃度勾配法によってサイズ分画した。15〜20kbpの範囲にあるDNA画分を集めて、*Bam*HI消化したEMBL3にライグーシヨして、フマーシ粒子内にパッケージングすることによってニツジン核ライブラリーを構築した。

## 【0053】

次いで、ニツジンPAL (Phenylalanine ammonia-lyase) ジノムクローンを、Ozeki et al. (1990) においてクローニツグされたPAL cDNA (ANT-PAL cDNA) をプローブとして用いてスクリーニツグした (Sambrook et al. 1989)。なお、ニツジン核ライブラリーのスクリーニツグのハイブリダイゼーシヨンは、6×SSC、60mMリソ酸ナトリウム (pH6.8)、10mM EDTA、1% SDS、0.02% ボリエニルピロリド、0.02% Ficoll 400、及び100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で68℃で終夜処理することにより行った。また、メンアラソの洗浄は、2×SSC、

0.5% SDSの溶液中で室温 15分で2回、0.1×SSC若しくは1×SSC、0.1% SDSの溶液中で室温 10分で2回、最後に0.1×SSC溶液中 68℃で30分を2回行うことによって実施した。

## 【0054】

その結果、8個のボジタイズ・クローンが得られた。かかるクローンについて制限酵素マッヅを作成したところ、それらは2種類に分類され、それらをおおの gDCPAL3および gDCPAL4と命名した。

## 【0055】

gDCPAL3について、Sambrook et al. (1989)に記載された方法でボジタイズ・クローンのライブラリーを培養し、λ DNAを抽出して Bam HI で切断し、ナイロ膜にサザン・トランスファーを行った。これをプローブとして ANT-PAL cDNAを EcoRI で切断した時に得られる DNA断片 (984 bp) の 5' 端を [<sup>32</sup>P] で標識したものを用いてサザン解析を行い、プローブがハイブリダイズする 2.77 kbp の DNA断片を得た。この DNA断片を、Bam HI で切断し calf intestine alkaline phosphatase (CIP) 処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニングして gDCPAL3-pro/SKを得た (図3参照)。次いで得られたプラスミド gDCPAL3-pro/SKを、制限酵素 Sal I と Apa I で切断し、Sambrook et al. (1989)に記載された方法で Exonuclease III および Mung bean nuclease を用いて、一連の欠失 DNA断片群を作成し、これらを用いて DNAの塩基配列を決定した。Ozeki and Takeda (1994) に示したニンジンから抽出した mRNA を用いたライマー・エクステンション法によって見い出されたバントの位置から転写開始点 (+1) を決定した。

## 【0056】

gDCPAL4 についても同様にして、上記に対応するプラスミド gDCPAL4-pro/SKを作成して、転写開始点を決定した。具体的には、ボジタイズ・クローン gDCPAL4のライブラリーから得た λ DNAを Hind III と Bam HI で切断し、同上のプローブを用いてサザン解析を行い、プローブがハイブリダイズする 1.63 kbp の DNA断片を Hind III と Bam HI で切断し CIP処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニングして gDCPAL4-pro/SKを得た。次いで得られたプラスミド gDCPAL4

4-pro/SKを、制限酵素Xba I と BstX Iで切断し、Sambrook et al. (1989)に記  
載された方法で Exonuclease IIIおよび Mung bean nuclease を用いて、一連の  
欠失 DNA断片群を作成し、これらを用いて DNAの塩基配列を決定した。

### 3) 結果

決定した gDCPAL3および gDCPAL4の塩基配列を比較したところ、gDCPAL3 プロ  
モーター領域には gDCPAL4には見られない不完全な逆向き繰り返し配列を持った  
miniature inverted-repeat transposable element (MITE) が、-1897 ~ -  
1599 (長さ 299 bp) および -1157 ~ -389 (長さ 769 bp) の2箇所に存在するこ  
とがわかった (図4)。これらの配列をそれぞれ IS1 および IS2 と命名した。

### 【0057】

これらの配列並びに挿入部位周辺の塩基配列について、それぞれオートシーク  
エンサー (ABI社製) でシーケンスを行った。IS1 の塩基配列を配列番号2  
に、IS2 の塩基配列を配列番号1にそれぞれ示す。

### 【0058】

これらのIS1及びIS2の性状は下記の通りであった。

#### ① IS1

配列番号2に示す塩基配列 (全長299bp) からなり、5' 末端及び3' 末端  
にはそれぞれ互いに不完全な逆反復配列 (32bp) を有し、また標的遺伝子であ  
るゲノムへの挿入部位にはTAの標的逆反復配列が見られた。このことからすでに  
報告されている Stowaway 属 (Bureau and Wessler (1994)) に属する新規なMI  
TE因子の遺伝子配列であることが推定された。IS1因子のヌクレオチド構造、並び  
に末端逆反復配列領域及び挿入部位領域の構造を、図2に示す。

### 【0059】

また得られた塩基配列の情報をもとに、市販のデータベース (例えばGENE TYX  
-MAC/CD1995) を用いて塩基配列及びアミノ酸のホモロジー解析を行ったところ  
、すでに報告されている Stowaway 属 (Bureau and Wessler (1994)) に属するMI  
TE様因子の遺伝子配列と末端逆反復配列において70~90%の割合でホモロジ  
ーがあり、このことから当該因子がStowaway属に属する挿入因子であることが確

認された(図5)。

【0060】

②IS2

配列番号1の塩基配列(全長769bp)からなり、5'末端及び3'末端に不完全な逆反復配列(158bp)を有し、また標的遺伝子であるゲノムへの挿入部位にAAGAAAGAAの標的重複配列が見られた。塩基配列のホモロジー比較を行ったが、既知挿入因子との相同性が見られず、このことから従来の挿入因子ファミリーに属さない新規なファミリーを構成する挿入因子、特にMITE様因子であることが判明した。このシステム構造、並びに末端逆反復配列領域及び挿入部位領域の構造を、図1及び図6に示す。

## 実施例2

(1) IS1, IS2, IS12および MU3のクロニンジ

(i) IS1 のクロニンジ (図7)

実施例1において塩基配列の決定のために作成した gDCPAL3プロモーター領域の3'端からの欠失 DNA断片を有するプラスミドの中から、-1581まで欠失したプラスミド (gDCPAL3-IS1/SK) を選び、これを KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、ScaI で切断し、アガロース・ゲル電気泳動によって 321 bp の DNA断片を切り出した。これを HincII で切断し CIP処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クロニンジした。このサフ・クロニンジによって得られた複数の独立クロニンの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA断片の挿入方向を調べ、pBluescript SK プラスミドのアルチ・クロニンジ部位の KpnI 側に IS1の5'側が挿入されているものを選び、これを IS1/SK とした。また pBI221 (Clontech Inc. ) を HindIII および SmaI で切断して得られたカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター (35S)断片をアガロース・ゲル電気泳動によって切り出し、HindIII および SmaI で切断し CIP処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クロニンジし、これを 35S/SK とした。IS1/SK を KpnI と HindIII で切断し、アガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA断片を切り出し、これを KpnI と HindIII で切断し CIP処理した 35S/SK プラスミドにサフ・クロニンジ



グシ、35S フロモーター領域の上流域にISI領域 (ISI Stowaway) を有する ISI-3 5S/SK を得た。

(ii) IS2 のクローニング (図 8)

実施例 1 において塩基配列の決定のために作成した gDCPAL3フロモーター領域の 3' 端からの欠失 DNA断片を有するプラスミドから、-389 まで欠失したプラスミド (gDCPAL3-IS12/SK) を選び、これを KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Dde I で切断し、フガロース・ゲル電気泳動によって 797 bp の DNA断片を切り出し、これを Hinc II で切断し CIP処理した pBlue script SK プラスミドにサフ・クローニングした。このサフ・クローニングによって得られた複数の独立クローンの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA 断片の挿入方向を調べ、pBluescript SK プラスミドのアルチ・クローニング部位の Kpn I 側に IS2 の 5' 側が挿入されているものを選び、これを IS2/SK-1 とし、またその反対方向、すなわち KpnI 側に IS2 の 3' 側が挿入されているものを IS2/SK-2 (reverse) とした。

【0061】

IS2/SK-1 を Kpn I と Hind III で切断し、フガロース・ゲル電気泳動によって インサート DNA断片を切り出し、これを Kpn I と Hind III で切断し CIP処理し 35S/SK プラスミドにサフ・クローニングし、35S フロモーター領域の上流域に IS2領域 (正鎖) を有する IS2-35S/SK を得た。

(iii) IS1 と IS2 のタンデム結合体のクローニング (図 9)

(ii) で得られた IS2/SK-2 (reverse) を KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Hind III で切断し、フガロース・ゲル電気泳動によって インサート DNA断片を切り出した。これを Pst I で切断して T4 DNA polymerase による末端平滑化後、Hind III で切断し CIP処理した ISI-35S/SK プラスミドにサフ・クローニングし、35S フロモーター領域の上流域に ISI領域と IS2領域とをタンデムに有する ISI2-35S/SK を得た。

(iv) MU3 のクローニング (図 10)

MU3 は gDCPAL3-IS12/SK を KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Sca I で切断し、フガロース・ゲル電気泳動によって 1,514 bp

の DNA断片を切り出し、これを Hinc II で切断し CIP処理した pBluescript SKプラスミドにサフ・クローニングした。このサフ・クローニングによって得られた複数の独立クローンの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA断片の挿入方向を調べ、pBluescript SKプラスミドのアルチ・クローニング部位の Kpn I 側に IS1 の 5' 側が挿入されているものを選び、これを MU3/SK とした。MU3/SK を Kpn I と Hind III で切断し、アガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA断片を切り出し、これを Kpn I と Hind III で切断し CIP処理した 35S/SK プラスミドにサフ・クローニングし、35S プロモーター領域の上流域に IS1 領域と IS2 領域とを、gDLPAL 3 に由来する領域の配列 (441 bp) を介して、有する MU3-35S/SK を得た。

(2) IS1, IS2, IS12 および MU3 の植物遺伝子発現ベクターへの組み込み (図 11

PABN-Hm1 (Mita et al. (1995)、名古屋大学・中村研三先生より分与) を Hind III で切断し、 $\beta$ -amylase プロモーター (1.7 kb) を切り出し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Xba I で切断し、CIP 処理した後、Ti-プラズミド領域とカナマイシン耐性遺伝子 (nos-プロモーター・ネオマイシンプラスミドプラスミドのコード領域 (nptII)・nos ターミネーター・ $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子のコード領域 (GUS)・nos ターミネーター) 及び 35S プロモーター・ハイグロマイシンプラスミドプラスミドのコード領域 (HPT)・nos ターミネーターを含む 10 kbp の DNA断片をアガロース電気泳動によって分離した。これに、35S/SK を Hind III で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Xba I で切断して得られた 35S断片をアガロース・ゲル電気泳動によって切り出して、サフ・クローニングし、PAB35S を作成した。この PAB35S を Xho I および Xba I で切断して、CIP 処理した後、アガロース電気泳動によって 35S DNA断片を切り除いてベクターを調製した。

【0062】

一方、前述により調製された IS1-35S/SK, IS2-35S/SK, IS12-35S/SK, 及び MU3-35S/SK の各々を Xho I および Xba I で切断してアガロース電気泳動によってインサート用の DNA断片 (導入遺伝子発現用カセット) を切り出した。

【0063】

かかるDNA断片を上記のベクターにライゲーションし、大腸菌 DH5α にトランスフォーマーメーションした。得られた大腸菌をカナマイシン 25 μg/L を含む LB 寒天培地 (1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1%塩化ナトリウム、1.5%細菌培地用寒天末) にまき、得られたコロニーからプラスミドを迅速プラスミド DNA抽出法により抽出し、得られたプラスミドの制限酵素マッピングすることによって、図 1 に示すように、pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35Sおよび pMU3-35S/AB35Sの各コンストラクトが作成されていることが確認された。

(3) *Agrobacterium tumefaciens* のコンピレントセル作製

*A. tumefaciens* EHA 101 のグリセロールストックから白金耳で菌体を取り、YEP 固体培地 (イーストエキストラクト 1%, バクトペプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.5% の YEP 培地に 1.5% になるように細菌培地用寒天末を加えてオートクレーフして固化させたもの) に塗布し、28℃で 2 日間、暗黒下で培養した。増殖した *A. tumefaciens* の単コロニーを爪楊枝でかきとり、1.5 ml の YEP 培地に植菌し 28℃で一晩振とう培養した。500 ml フラスコに 80 ml YEP 培地を入れ、増殖した *A. tumefaciens* の菌液を 0.8 ml 加え、28℃で  $OD_{600} = 0.4$  まで振とう培養した。これを氷冷したあと、あらかじめ氷冷しておいた遠心管に移し、6,000 rpm で 5 分間、4℃のもとで遠心し、上澄みを除いて 10%グリセロールを 20 ml 加え懸濁した。この操作を 3 回繰り返し、培地を完全に除いて *A. tumefaciens* のコンピレントセルを取得した。ストック用に、400 μl の 10%グリセロールに懸濁後、チューブに 40 μl ずつ分注し、液体窒素中で急速凍結した。

(4) プラスミド DNA の *A. tumefaciens* への導入

(2) で得られた各種コンストラクト (プラスミド pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35S および pMU3-35S/AB35S) を、エレクトロポレーション (島津製作所製 GTE-10 使用) により *A. tumefaciens* コンピレントセルに導入した。

【0064】

具体的には、(3) で調製したコンピレントセル 40 μl に、(2) で作成した

ラスミ F pIS1-35S/AB35S (IS1) , pIS2-35S/AB35S (IS2) , pIS12-35S/AB35S (IS12) および pMU3-35S/AB35S (MU3) 、並びに比較対照のためにプラスミド pAB3 (35S) を、それぞれ約 100 ng ずつ混合して、エレクトロポレーション用セルに移した。電気パルス (1.2 kV , 35  $\mu$ F , 550  $\Omega$ ) を与え、すばやく 1 ml の YEP 培地を加えて 28  $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。50  $\mu$ l ほどとって、50  $\mu$ g / L のハイグロマイシンを含む YEP 固体培地に塗布し、28  $^{\circ}$ C で 2 日間、暗黒下で培養した。生えてきた単コロニーを再び 50  $\mu$ g / L のハイグロマイシンを含む別の YEP 固体培地に白金耳を用いて軽く広げ、28  $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。この菌体の一部をとり、50  $\mu$ g / L のハイグロマイシンを含む YEP 培地 5 ml に植菌し 28  $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。

(5) タバコ・リーフチイヌク法による転写促進型挿入因子・レポーター遺伝子の導入と形質転換タバコの育成

タバコ (SR 1) の葉を 10 % 次亜塩素酸溶液に浸け、スターラーで軽くかき混ぜながら 2 分間葉さじで気泡をとり、液を新しくして更に 5 分間同様の操作を行った。葉を取りだし滅菌水につけて軽くかき混ぜた。次亜塩素酸溶液を新しい溶液に置き換えて、同様の操作を計 3 回行なった。滅菌したペーパータオルを用いて軽く水気を除いた後、コルクボラーで葉をくりぬきリーフチイヌクとして (葉脈は除く) 、これを 10 ml の滅菌水につけた。YEP 培地 5 ml で培養した上記の形質転換済 *A. tumefaciens* に滅菌水を加えて OD = 0.25 に調整し、この中に上記リーフチイヌクを 1 分間浸けた。次いで、リーフチイヌクと菌液を滅菌ペーパータオルにあげ、別の滅菌ペーパータオルでできるだけ水分を除いた。

【0065】

葉の裏側を上にして MS 感染培地におき、25  $^{\circ}$ C で 2 日間、暗黒下で培養した。その後それぞれのリーフチイヌクを MS 再分化培地で拭くようにして除菌を行ったあと、同様に葉の裏側を上にして別の MS 再分化培地において 25  $^{\circ}$ C のもとで培養した。2 週間ごとに新しい MS 再分化培地に植え替えた。

【0066】

1 か月後、再生シュートの数を計測した。結果を表 1 に示す。

【0067】

【表1】

タバコ・リーフナスクにおける再生シュート数の比較

ナスク毎のシュート数	35S	IS1	IS2	IS12	MTU3
0 (本)	73	49	56	50	54
1	26	21	20	23	27
2	13	17	11	14	12
3	10	14	8	5	7
4	3	6	9	8	3
5	2	1	2	1	5
6	1	3	3	2	0
7	0	1	2	5	2
8	1	0	0	3	2
9	0	0	0	1	0
10	0	0	2	1	0
11	0	0	0	1	1
12	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	2	0
ナスク total	129	112	113	117	113
シュート total	118	151	164	244	150
平均値	0.91	1.35	1.45	2.09	1.33

(本)  
(本)  
(枚)  
(枚)

【0068】

シュートが成長したら、マスとピンセットを用いて切り取り、MS 発根培地に植えた。

(6) ニンジン不定胚を用いた転写促進型挿入因子・レポーター遺伝子の導入

ニンジン胚軸を約1cmずつに切断し  $4.5 \times 10^{-6}$  Mの 2,4-D (2,4-ジクロロエノキシ酢酸) を含む MS 液体培地に入れ暗黒下で 24 時間培養した後、2,4-D を含まない MS 液体培地に入れ暗黒下で 3 日間培養した。培地を替えて同様に 7 日間培養し、ニンジン不定胚を作成した。

【0069】

YEP 培地 5 ml で培養した形質転換済み *A. tumefaciens* を 3,000 rpm で 1

0 分間遠心し、上澄みを除いて MS 培地を約 30 ml 加えて懸濁した。この操作を 2 回繰り返し YEP 培地を完全に除いた。その後 3,000 rpm で 10 分間遠心して上澄みを除き、10 mg / l のアセトシリングを含む MS 培地を加えて OD<sub>600</sub> = 0.3 前後になるように調節した。これに糊を用いて集めたニンジン不定胚を加え 5 分間軽く振とうした。滅菌ペーパータオルでできるだけ不定胚の水分を除き、10 mg / l のアセトシリングを含む MS 培地に浸けて 22℃ で 3 日間、暗黒下で培養した。滅菌ペーパータオルでできるだけ不定胚の水分を除き、500 μg/L のカルベニシリンを含む MS 液体培地に浸して軽く振るようにして洗い、同様に水分を除去した後 500 μg/L のカルベニシリン及び 100 μg/L のカナマイシンを含む MS 寒天培地において暗黒下で培養した。

【0070】

1.5 ～ 2 カ月後、カルスを再生したヒポコチルの数を計測した。結果を表 2 に示す。

【0071】

【表 2】

		3SS	IS1	IS2	IS12	MU3
+ 24D	カルスを再生したヒポコチル数	5	6	10	9	8
	総本数	78	56	60	61	63
	再生率	6.4	11	17	15	13
- 24D	カルスを再生したヒポコチル数	3	9	12	6	4
	総本数	77	62	62	64	58
	再生率	3.9	13	19	9.4	6.9

カルスを再生したニンジンヒポコチルの数の比較

【0072】

(7) 形質転換タバコにおける GUS 活性の測定

多数の形質転換タバコ植物体よりランダムに独立の個体を選び、その葉から核 DNA を抽出してサザン解析法によって遺伝子導入がなされていることを確認した。その後、その葉からタンパク質を抽出し、GUS 活性を測定した。具体的には、形質転換したタバコの葉を 0.3 g とり、GUS - Light (Tropix) を用いて蛋白

質を抽出した。Bio - Rad フロテイングキットを用いて蛋白質濃度測定を行った後、GUS - Light ( Tropix ) 及びルミノメーター - Lumat LB9501 ( ベルトルドジャパン ) を用いて5秒間 GUS活性を計測した。結果を図12に示す。なお、図中縦軸に示すGUS活性は、ルミノメーターで得られた発光量をタンパク質量で割った、蛋白質量あたりの発光量として示したものである。

### 【0073】

この結果を基にして、各コンストラクトにおける活性の分布を調べてみると、図13に示すように、PIS1-35S/AB35S (IS1) , PIS2-35S/AB35S (IS2) , PAB35S/AB35S (IS12) および PMU3-35S/AB35S (MU3) はいずれもコントロールのPAB35S (35S) と比較して、GUS 活性が3000 以下の個体数が総数の60%~70%を占め、活性の低い個体の数が増加することがわかった。

### 【0074】

すなわち、コントロールの35Sのみでは、染色体上で遺伝子発現が不活性化されている cryptic site に遺伝子が挿入された場合には、挿入された遺伝子も不活性化されて OFFになるためにカナマイシン耐性を示す nptII 遺伝子の発現が抑制されてしまう。その結果、植物はカナマイシン感受性のままであり、核染色体中に遺伝子が挿入されているにもかかわらず、その植物個体はカナマイシン培地において再生してこない。それに対して、上記の本発明の因子が挿入されると、染色体上で遺伝子発現が不活性化されている cryptic site に遺伝子が挿入され、場合においても、遺伝子発現の不活性化や遺伝子発現の OFFは起こらず、発現量は低くとも発現が起こるようになり、カルス再生効率が高まり、GUS 活性の低い植物個体の数が増加することが示された。

(a) タバコの場合、IS1もしくはIS2単独で入っていることにより、シュートの再生効率がコントロールの約1.4倍になり、特にIS1とIS2との両方をタンパク質で入れた場合に約2倍のシュートが得られた。しかし、IS1とIS2との間にgDPAAL3由来の配列がついていて、この効率の低下が観察される。これはおそらくgDPAAL3由来の配列のIS1とIS2以外の部分に、転写抑制を起すシス・エレメントが存在していることによるものと考えられる。IS1とIS2に挿入されるDNA配列によるが、上記実施例においては、IS1もしくはIS2単独あるいはIS1お

およびIS2のタンデム結合体が再生効率を高くすることがわかった。

(b) ニンジニにおいても同様な結果が得られ、2,4-dichlorophenoxyacetic acid

(2,4-D)を含む培地で培養して脱分化的増殖条件下で見た場合のみならず、2,4-

Dを含まない培地中で分化条件下でカルスを誘導した場合においてもいずれの場

合も再生効率の向上が見られる。もっとも再生効率の向上が見られたのはIS2で

あった。

(c) ここで『再生効率が高まる』には、次の3つの可能性がある。

① Ti-plasmidの植物細胞への導入効率が高くなった可能性。

② nos-プロモーターの活性がIS1もしくはIS2によって上昇したため

に nptII 遺伝子の転写が促進されて多量の遺伝子産物が生産されたために、選抜

に用いたカナマイシン含有培地で生育できる細胞の数が増え、その結果細胞から

の再生効率が高くなった可能性。

③ IS1もしくはIS2がこれらを含む近傍の遺伝子領域の活性化を行う、

もしくは不活性化することを防いでいる可能性。

【0075】

Ti-plasmid による遺伝子の導入は植物染色体の決まった位置に挿入されるこ

とはなく、どこに挿入されるかは決まっていない。このため、染色体の構造によ

って決定している active site に挿入されるか、あるいはグノム DNA のメチル化

などによってその近傍の遺伝子が不活性化されてしまっている cryptic site に

挿入されるかは偶然による。もしも導入遺伝子が cryptic site に挿入された場

合には、その染色体の『場』の影響を受けるため、その導入遺伝子も不活性化さ

れると考えられている。

【0076】

本発明で用いたコンストラクトは IS1 またはIS2をnptII 遺伝子 (

カナマイシン耐性遺伝子) のターミネーター側に挿入したものであり、これでカ

ナマイシン耐性植物の再生効率が高まるということは nos-プロモーターに直接

シス活性化を引き起こすような形ではなく、nptII 遺伝子の活性化が維持された

細胞の数が多くなっていることを示している。

【0077】



このことから、これら ISI または / および IS2 配列は、挿入遺伝子 (外来遺伝子) の不活性化を抑制していることが考えられる。

【0078】

この考え方が正しいければ、(i) ISI または / および IS2 の直下にある GUS の転写活性はコントロールと比較して高くならず、また nptII および HPT (ハイグロマイシン耐性遺伝子) の転写活性も高くならないこと、(ii) すべての植物個体 (細胞) で、これらの発現が遺伝子が導入された染色体の位置に関わりなく、コントロールで見られる植物個体 (細胞) ほどの大きな活性の違いが起らず、ほぼ一定の値を示すことが考えられる。

【0079】

今回得られた GUS 活性の測定結果から、GUS 活性はコントロールと比較して高くなっていないことが確認できた。このことから上記 (i) の推定が正しいと考えられる。(ii) については、植物個体ごとの大きな活性の違いは見られなかったが、耐性遺伝子 (nptII) の発現活性量の閾値 (threshold level) が非常に低いこと、すなわち nptII 遺伝子が少量でも発現すれば、カナマイシン耐性植物として再生して考えることが考えられる。35S のみのコントロールにおいては、導入遺伝子が cryptic site に挿入された場合には、導入遺伝子は不活性化され完全に遺伝子発現は OFF になる。これに対して、ここで用いている因子を導入することによって、OFF 状態は解除されるが、その活性の量 (volume) は高くならず、非常に低いままとなる。このために再生効率が増加するが、GUS 活性が低い植物個体の数が増加したものと考えられる。

【0080】

遺伝子組み換え植物の作出において最も大きな障害は、導入した遺伝子発現が植物個体ごとによって大きく発現活性が異なること、並びに、培養や世代を経るうちに不安定化し、導入した遺伝子の活性が消失 (ジーン・サイレンシング) されてしまうことである。本発明における ISI または / および IS2 は植物、特に双子葉植物における遺伝子導入において、このジーン・サイレンシング等による遺伝子発現の不活性化、若しくは活性のパラッキ、若しくは不安定性を解消するも

のであると考えられる。従って、本発明のシ-ンサイレンシ-ン抑制因子を遺伝子組み換え植物体の作出に利用することにより、導入遺伝子の発現を安定に行うことができ、その結果、遺伝子導入後に通常行うスクリーニン-グおよび育種すべき組み換え植物体の蒔数を著しく減らすことが可能になり、また組み換え植物体の製品・品種の安定性確保するものとなると期待される。

【0081】

なお、本発明で引用する文献は下記の通りである。

1. Bureau, T. E. and Wessler, S. R. Stowaway : a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell*, 6 : 907-16 (1994)
2. Mita, S., Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. Sugar-inducible expression of a gene for  $\beta$ -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 107 : 895-904 (1995).
3. Ozeki, Y., Matsui, K., Sakuta, M., Matsuoka, M., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N. and Tanaka, Y. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 80 : 379-387 (1990).
4. Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J. Structure and expression of chalcone synthase gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiol.*, 34 : 1029-1037 (1993).
5. Ozeki, Y. and Komamine, A. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture : Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol. Plantarum*, 53 : 570-577 (1981).
6. Ozeki, Y. and Takeda, J. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38 : 221-225 (1994).
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning*, a

gggacititit taasaatacc catcigttaa attatititit taasaatact accatcittt 60  
tcattgittit taasaatacc ttttcataaa tttttttttt caaaaatacg atttgcacct 120  
tttgcacct catttgcacc ctltggcggc gcagccgtaa agttggccag tgggttgc 180  
aaagtgc aaagtgtt aaagtgc aaagtgc caaaagtgc aaataaaat 240  
ggaagtgc aacagtgc acttgcatt caactagtt aactgaaac tgaagtgc 300  
aaaaagtgc aatgggtgc caactaaatg caactgaaa ctgtaaagtaa caacagatgt 360  
atgtgtgcc cctggcgggg cgttagatt acaatagaa caactgaatg caatcatatg 420  
caactgaata caactatag caatcatata tgcattaca aatcctgatt tcaagtcca 480  
gttttcgaat gtcatittcg aatcgtatat atatatatat atatatatat cgttttcgaa 540  
aatgacattc gaaaaatgaa acttgaatc aggaattcag ctgcataaga agttgcaaaa 600  
gaggttgc caagcctggc gccgccctgta gttgcataatg agttgcaaa agttgcaaac 660

720 agtatttttg aaaaaagat ttatgaaa ggatlttta aaaaatattc tggaaagtag  
769 tatttlgaa aacaataaaa gaaaagtag gtagtttgt agatttccc

<210> 2

<211> 299

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 2

60 ctcccacgt cccattttat gtagcccat ttcttttgg ggaagttca aaaaaataa  
120 ctagaatat ttactatttt ttaacacat tttaacat tttaacacac aactatata  
180 ttatacat ttatatata aataaacat attaacacca ctactttct ccaatactc  
240 aatctata tttaatattg atagttcac cactttacc acttttcaac taactttact  
299 acattttct taatctcgt gaaagtcaaa ctacttaca taaaatggga cagaaggag

<210> 3

<211> 1192

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 3

60 ggtaccggc ccccccga ggtcacctccc tagtcccat ttatgtgac ctactttct  
120 ttgggagc tctcaaaaaa aataaccctag aatactact attttttaa actattttc  
180 actattacac ccaaccaact tataatttat actattttat tattaataa acactattac  
240 acccaact ttctccact atctcaatc tattataa tatgtaggg tccaaccaat  
300 taccacatt tcaactacat ttactacat ttctttaatc tccgtgaaag tcaaacatc  
360 tcacataaaa tgggacagag ggagtaatta ttaatttaa tagcgggat cgataagctt  
420 atcgtaccg tctcagattc gcaaacataa aagaaaaagg gatctttta aaaaatacca  
480 tctgtaaaat tatttttta aaaaatactac catcttttc attgtttta aaaaatacctt



ttcataaat ttttttca aaaatacgaat ttgcaacttt tgcacaacct ttgcaacct  
600 tggcgcgcg agcggttcaaa gttgcagttg aggtttgcaaa agtttgcaaat gattttgtaa  
660 aagtttgcaaa tgggtttgca aagtttgcaaa ataaaaatgg aagtttgcaaa cagtttgcaac  
720 tgcatttgca actagtcca ctgaaaaactg taagtttgcaaa aagtttgcaaa tgggtttgca  
780 actaaatgca acttgaaaaact gtaagttcaaca acagatgttat ggtgtgcccc tggcgggggcc  
840 gttagatttac aatagaatca actgaatgca atcatatgca actgaatata actatatagca  
900 atcatatata caattacaasa tccgtatttc aagttccagt tticggaatgt cattttcgaa  
960 atcgatatata atatatata atatatata atttcgaaaa tgcacattcgaa aaacttggaac  
1020 ttgaaatcag gaattcagct gcatatggaag ttgcaaaaaaga ggttgcaaca cggctggcgcc  
1080 cgccctgtagt tgcaaaatgag gttgcaaaaag ttgcaaaaacag tatttttgaa aaaaagattt  
1140 tatgaaaaagg tatttttaaa aataattctg gaaagttagta tttttgaaaa caataaaaga  
1192 aaaagtaggt agttttgtag atttccaga cctcgagggg gggccccggtta cc

<210> 4

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 4

gttgcaaa

8

<210> 5

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 5

gttgcaac

8

<210> 6

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 6

tttgcaaa

8

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 7

tttgcaac

8

<210> 8

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 8

tatgcaa

7

<210> 9

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 9

aatgcaa

7

<210> 10

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 10

gggacitit taasaatacc catcigttaa attatitit taasaatact accatitit  
120 tcatigitit taasaatacc tttcataaa tttttitit caasaatacg attgcaact  
158 ttgcaact catlgtcaac ctggggcggc gtagccgt

<210> 11

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 11

acggctggcg cggcctgtag ttgcaatga gttgcaaaa gttgcaaca gtatitiga  
60 aaaaaagat ttatgaaaag gtatititaa aataatct ggaaggtagt attitgaaa  
120 acaataaag aaaaggtagg tagtttliga gattccc  
158

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 12

ctccctacgt cccatitit gtagcccat tt  
32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 13

aaactcattc acataaaatg ggcacagagg ag

32

<210> 14

<211> 1553

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 14

ggtaccgggc ccccccgcga ggtcacctccc tagctcccat ttatgtgac ctcatcttct  
60  
tttgggacg tctcaaaaaa aataaccctag aatacttact attttttaac actattttc  
120  
actattacac ccaccaactc tatattttat actattttat tattaataaa acactattac  
180  
accactact ttctccact atctcaaac tatattaasa tatgtatagg tccaccactt  
240  
taccacttt tcaacttact ttacttact ttctttaac tccgtgaaag tcaaacctcat  
300  
tcacataaaa tgggcacagag ggcgtaatla ttaattttaa taaattatat gtgatttga  
360  
ttatgtgtgg attcttgata aaatalacac ggttgatat aaattctaaa gattttaacca  
420  
caatgtttca aatctcata gattttagta ggcattcaaaa aatttaaat acgttcaaaa  
480  
atctcataaa attcatcat ttattaaac caaaaaaac cagtaatat tgcacatcag  
540  
attttaaga attttaaat gaaacaatc agttgaaac catgagattt taaaatataa  
600  
ttaaaatic taatlgata ccaccagatt ttgtaaaata atttaaat ttatlgat  
660  
attcaagatt ttaatatat ttaataatc tgcattctgaa ttacaaaaaa tgcittaaaat  
720  
ctgaaacca tagctccctc cagattcgca aacataaaaa gaaaaaggat ctttttaaaa  
780  
atacccatct gtaaatlat tttttaaaa atactacat ctttttcat gtitttaaaa  
840  
atacctttc ataatittt ttttcaaaa atacgatttg caacttttgc aacctcattt  
900  
gcaaccttgg gcggcgacgc cgtaaaaagt gccagtggagg ttgcaaaagt tgcaaaatgag  
960  
tttgaataag ttgcaaatga ggttgcaaaa gttgcaata aaaaatggaaa gttgcaacag  
1020  
ttgcaactgc aattgcaact agttcaactg aaaaactgtaa gttgcaaaaag ttgcaaatga  
1080  
ggttgcaact aaatgcaact gaaaaactgta agtlaacaaca gatgtatggt gtgccccctgg  
1140





cgggccggt agattacaat agaatacaact gaatgcaatc atatacaact gaatacaact 1200  
atatgcaatc atatacgaa ttacaataatc tgatttcaag ttccagttt cgaatgtcat 1260  
tttcgaaatc gatatataata tatataataata tatatacgatt tcgaaaaatga cattcgaaaa 1320  
ctgaaacttg aatacaggaa ttcagctgca tatgaagtig caaaaagaggt tgcaacacgg 1380  
ctgcgcgcgc ctgtagtgc aatagaggt gcaaaaagtig caaacagtat ttltgaaaaa 1440  
aagattttat gaaaaagtat ttltaaaaat aattctggaa gtagtatatt ttgaaaaaca 1500  
taaaagaaa gtaggtagt ttlttagatt tccagacgg tatcgataag ctt 1553

【図面の簡単な説明】

- 【図1】本発明のMIT E様因子、IS 2 因子の構造を示す。  
【図2】本発明のMIT E様因子、IS 1 因子の構造、及びその末端逆反復配列、挿入重複配列（下線部分のTA）を示す。  
【図3】gDCPAL3-pro/SKの構築方法を示す概略図である。  
【図4】ニンジンのPAL遺伝子gDCPAL3およびgDCPAL4との構造を比較した図である。

- 【図5】本発明のMIT E様因子（IS 1 因子）の塩基配列を、従来公知のStowaway属の塩基配列（BureauおよびWessler, Plant Cell, 6 : 907-917（1994））と比較した結果を示す図である。黒字に白抜きの配列が相同性が見られる末端逆反復配列である。

- 【図6】本発明のMIT E様因子、IS 2 因子の末端に見られる不完全逆反復配列、挿入重複配列（下線矢印部分のAAAA G A A A A）を示す。

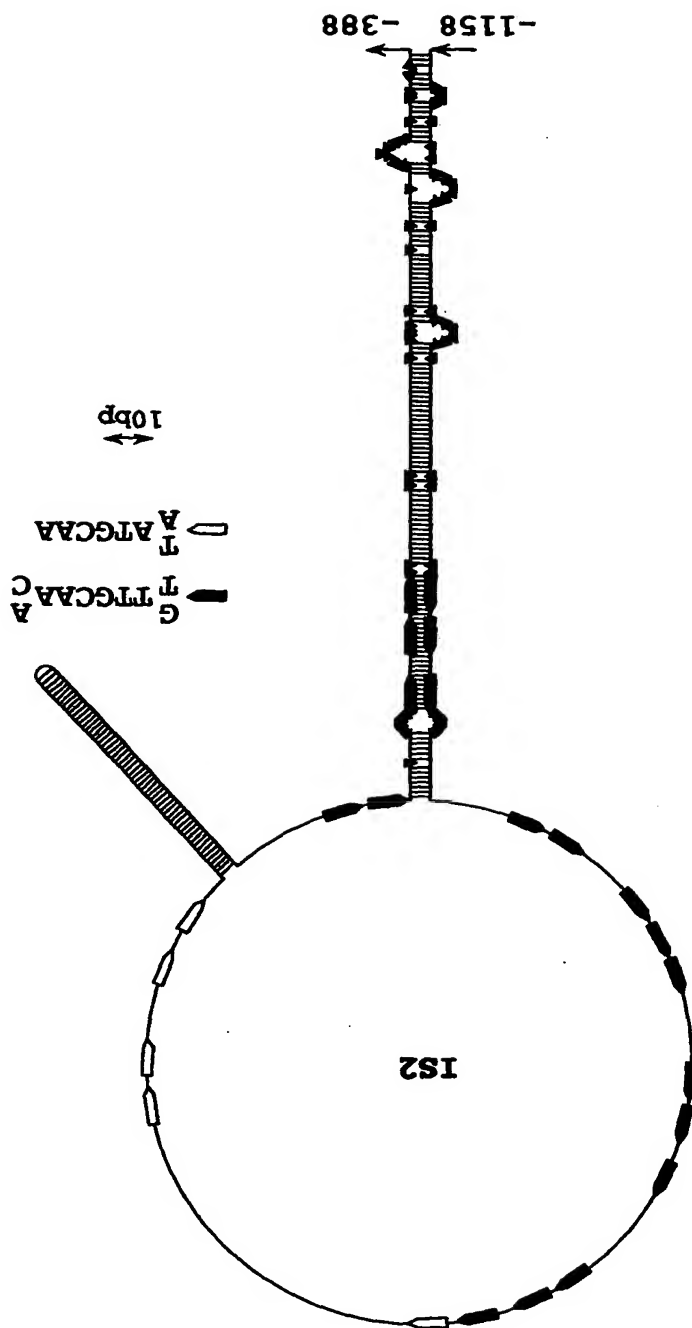
- 【図7】IS1-35S/SKの構築方法を示す概略図である。  
【図8】IS2-35S/SKの構築方法を示す概略図である。  
【図9】IS12-35S/SK の構築方法を示す概略図である。  
【図10】MU3-35S/SKの構築方法を示す概略図である。  
【図11】pIS1-35S/AB35S、pIS2-35S/AB35S、pIS12-35S/AB35S、pMU3-35S/AB35Sの構築方法を示す概略図である。

- 【図12】各コンストラクトにおける形質転換タバコのGUS活性をみた実施例1の結果を示す。IS1 は pIS1-35S/AB35S を導入した形質転換タバ

コ、IS2 は pIS2-35S/AB35S を導入した形質転換タバコ、IS12は pIS12-35S/AB35Sを導入した形質転換タバコ、MU3 はpMU3-35S/AB35Sを導入した形質転換タバコ、35S はこれら因子を導入していないpAB35Sそのものを導入した形質転換タバコ（コントロール）である。

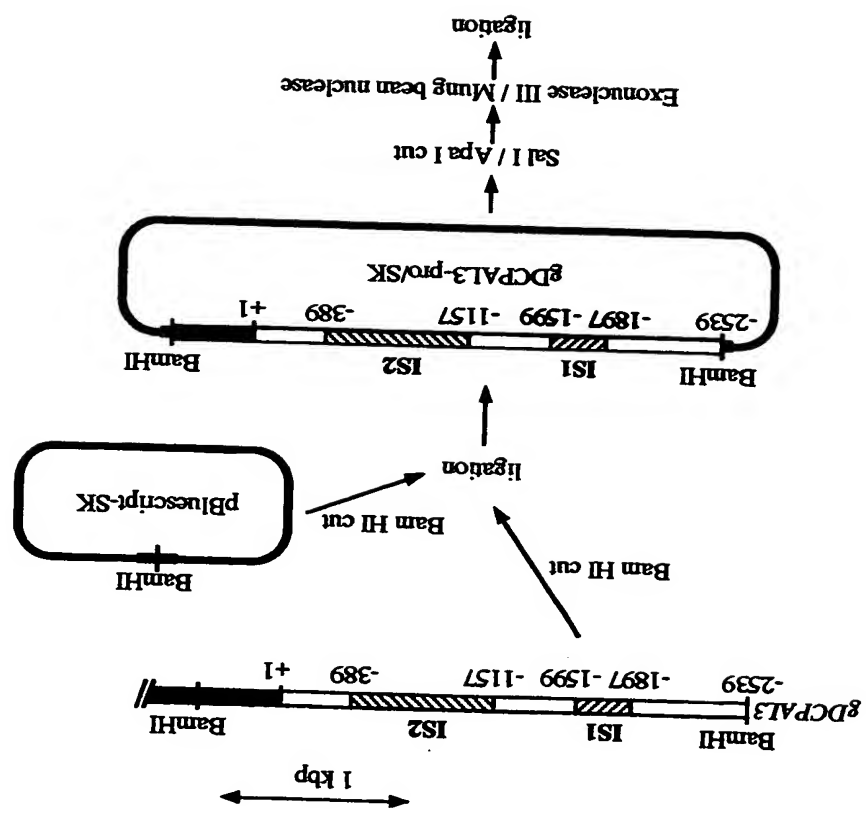
【図 13】各コンストラクトにおける形質転換タバコのGUS活性の出現度数分布をみた図である。

IS2 因子の構造





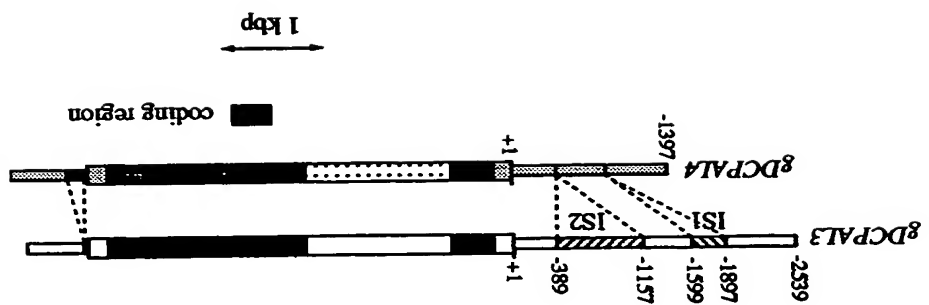
ニジシ *gDCPAL3* 遺伝子からの IS1 因子および IS2 因子のクローニング



【図 3】

【図 4】

ニンジン PAL 遺伝子 gDCPAL3 および gDCPAL4 の  
構造の比較



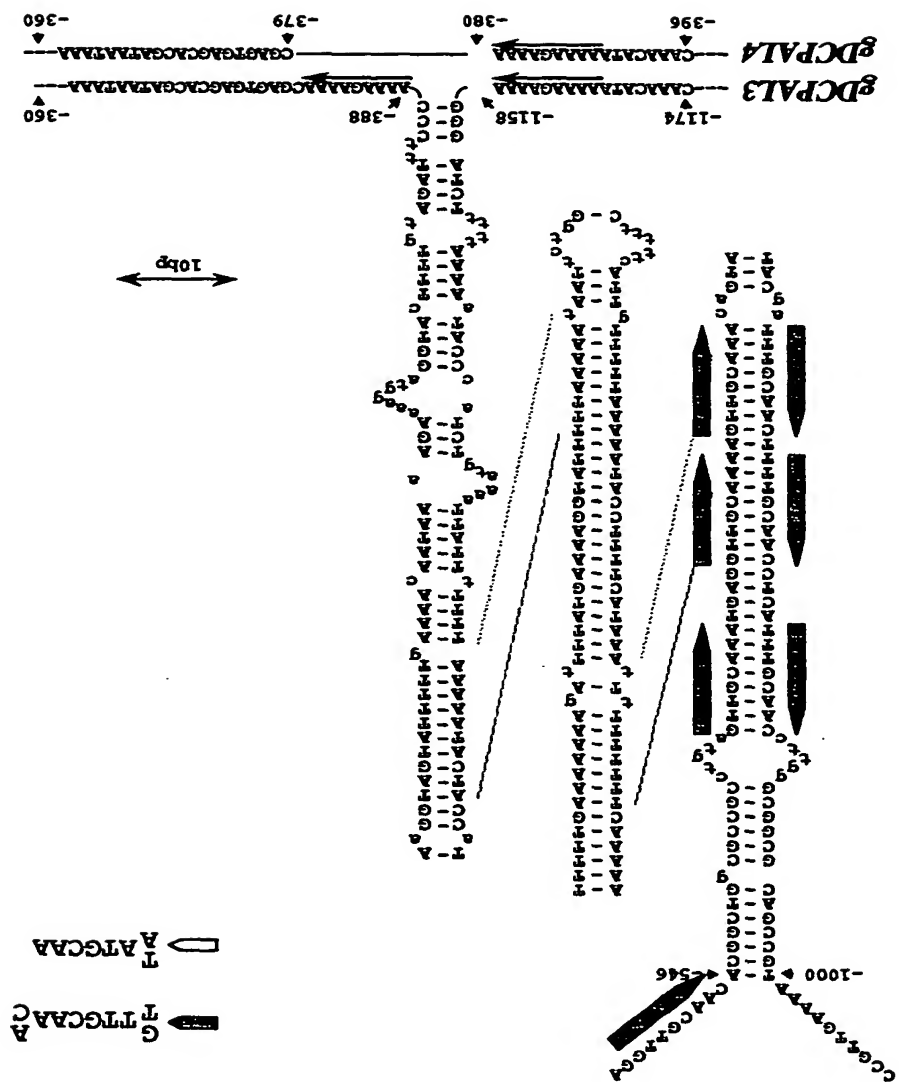
【図5】

ニンジンPAL遺伝子gDCPAL3から見出された  
IS1因子と既知のSlowaway遺伝子との相同性の比較

Slowaway

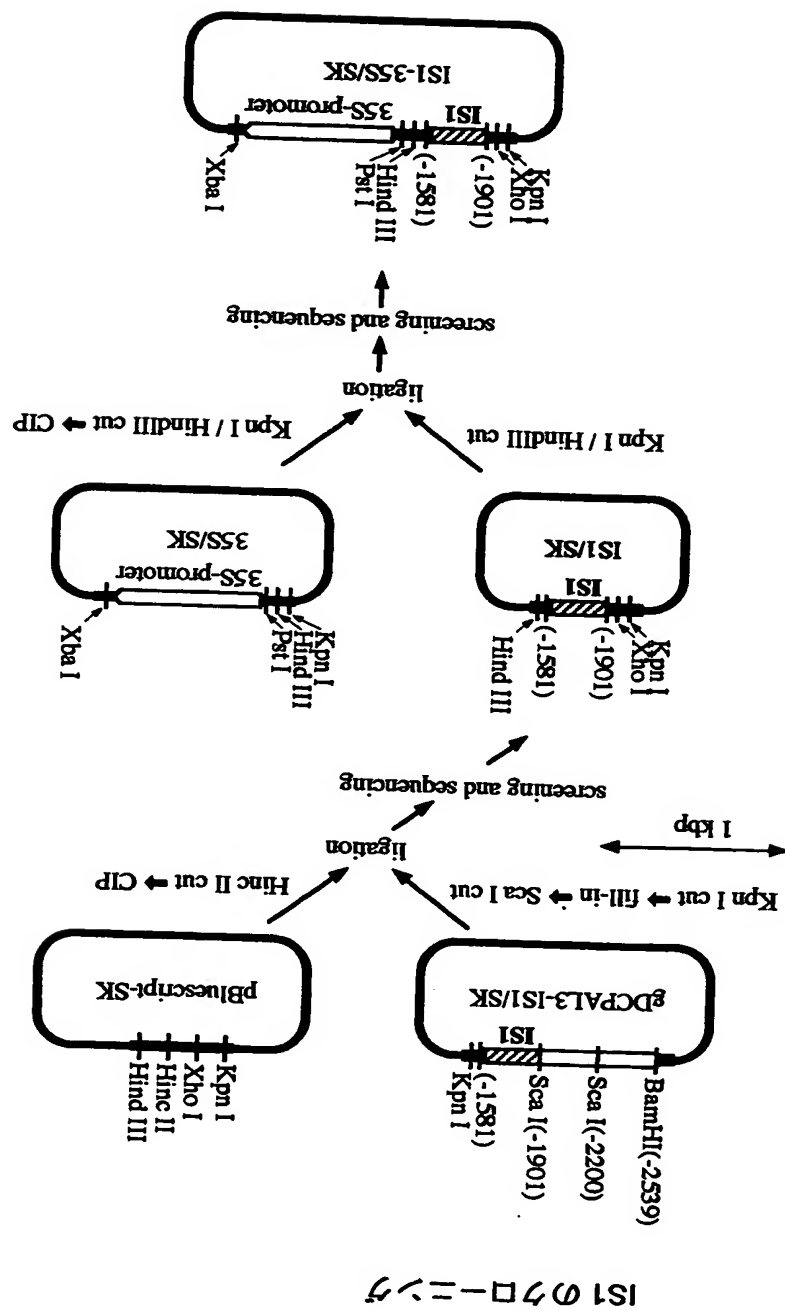
Gene	Position	size(bp)
IS1 因子	(5'-1597)	303
carrot DCS	(5'-514)	253
carrot DCS9	(5'-409)	249
petunia GMS	(4n1 884)	122
tomato PAL	(5'-494)	248
parsley PR2	(5'-418)	243
tobacco GNM	(5'-209)	244
pea lectin	(5'-1296)	275
rape EPSP	(1n5 1635)	220
potato patatin (1n2 922)		259
rice PCNA	(5'-432)	122
maise se1n	(3' UTR)	163
wheat AMT	(5'-458)	100
barley RGA4	(1n3 839)	159
sugarcane PEPC (1n6 2675)		267
sorghum PEPC (5'-469)		255

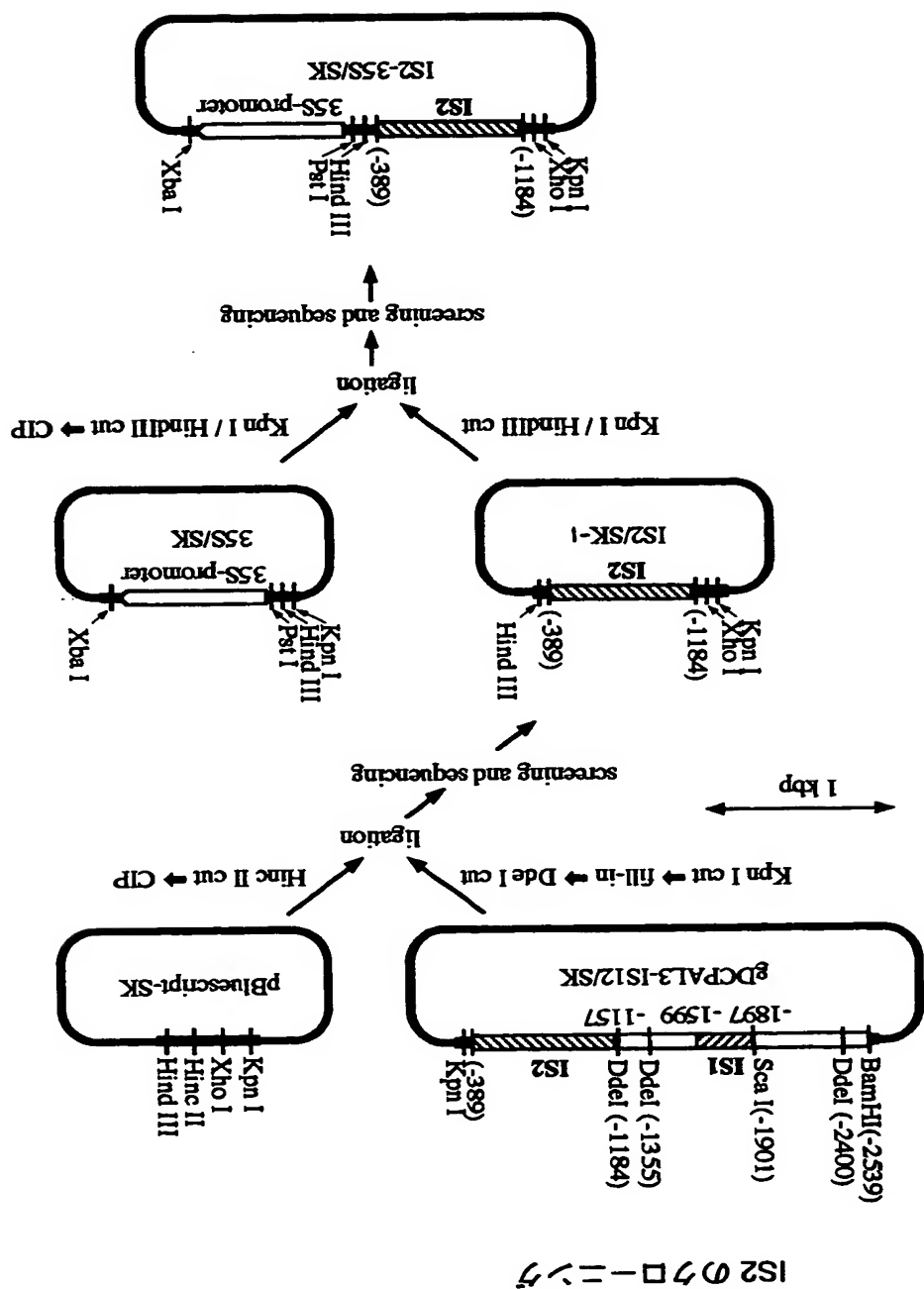
IS2 因子の末端逆反復配列の構造と挿入部分の塩基配列



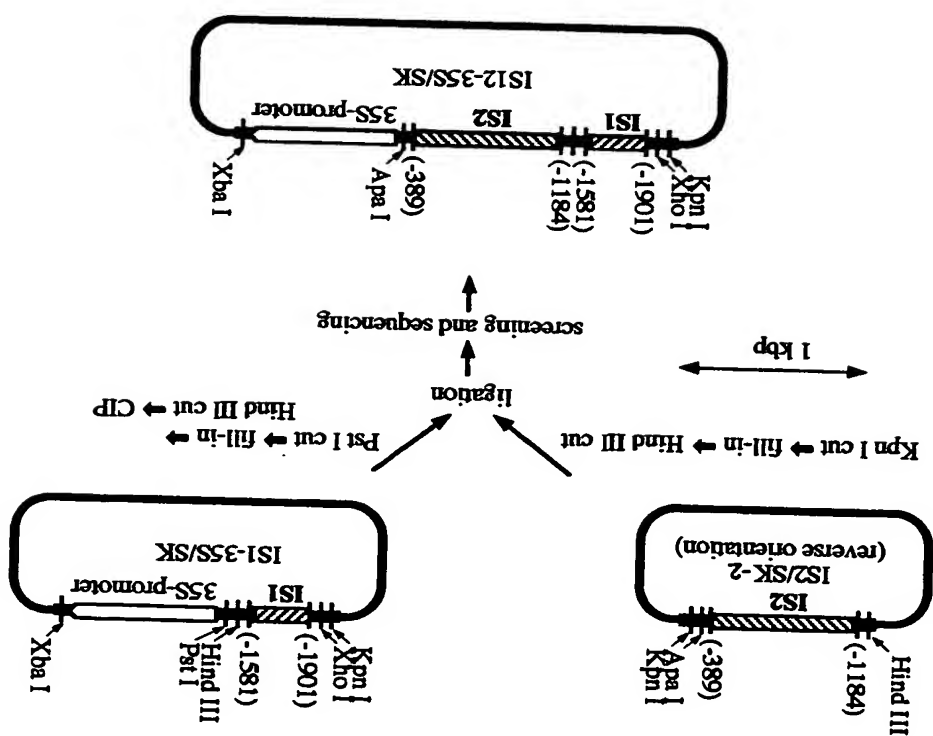


【図 7】

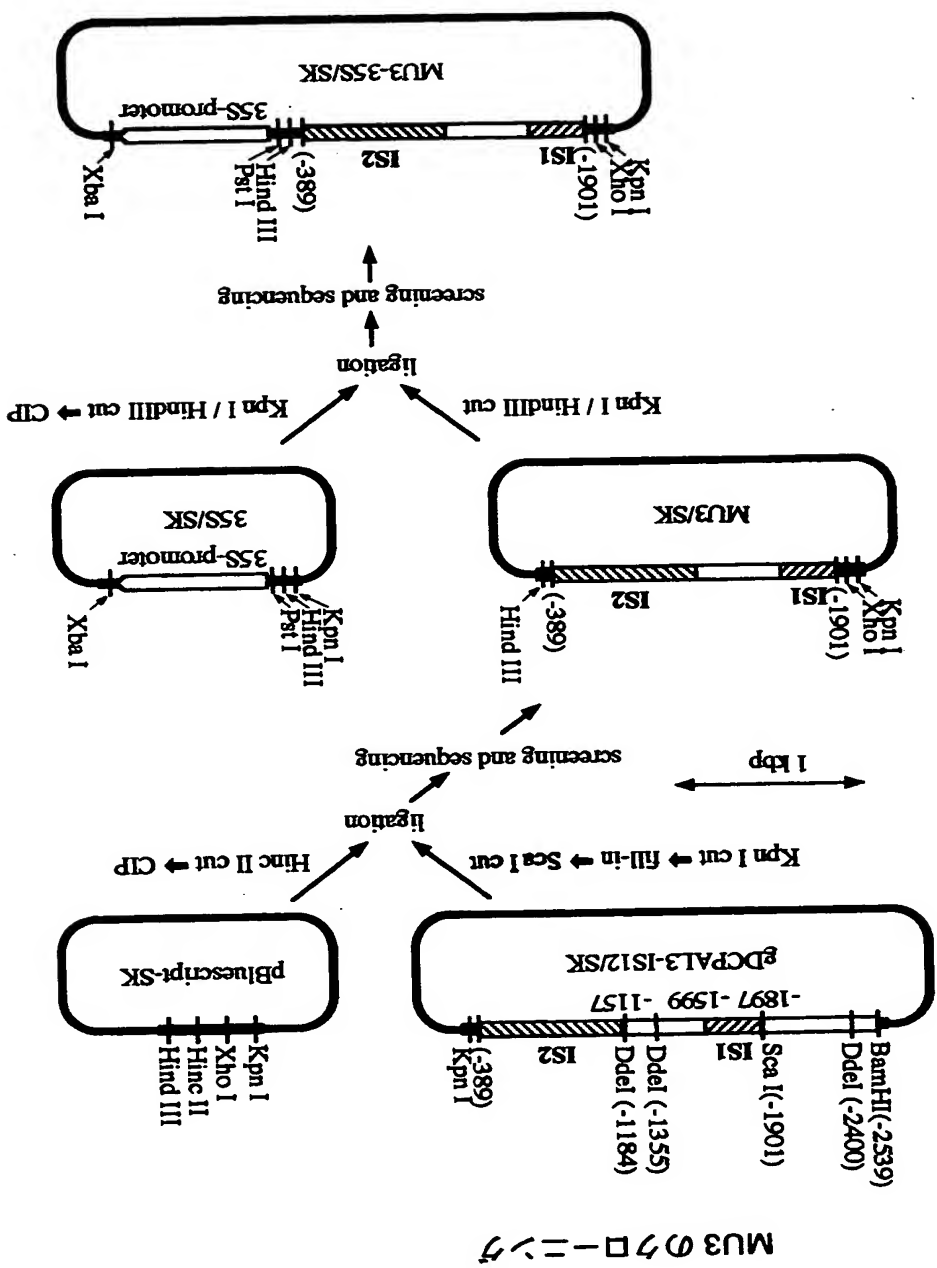




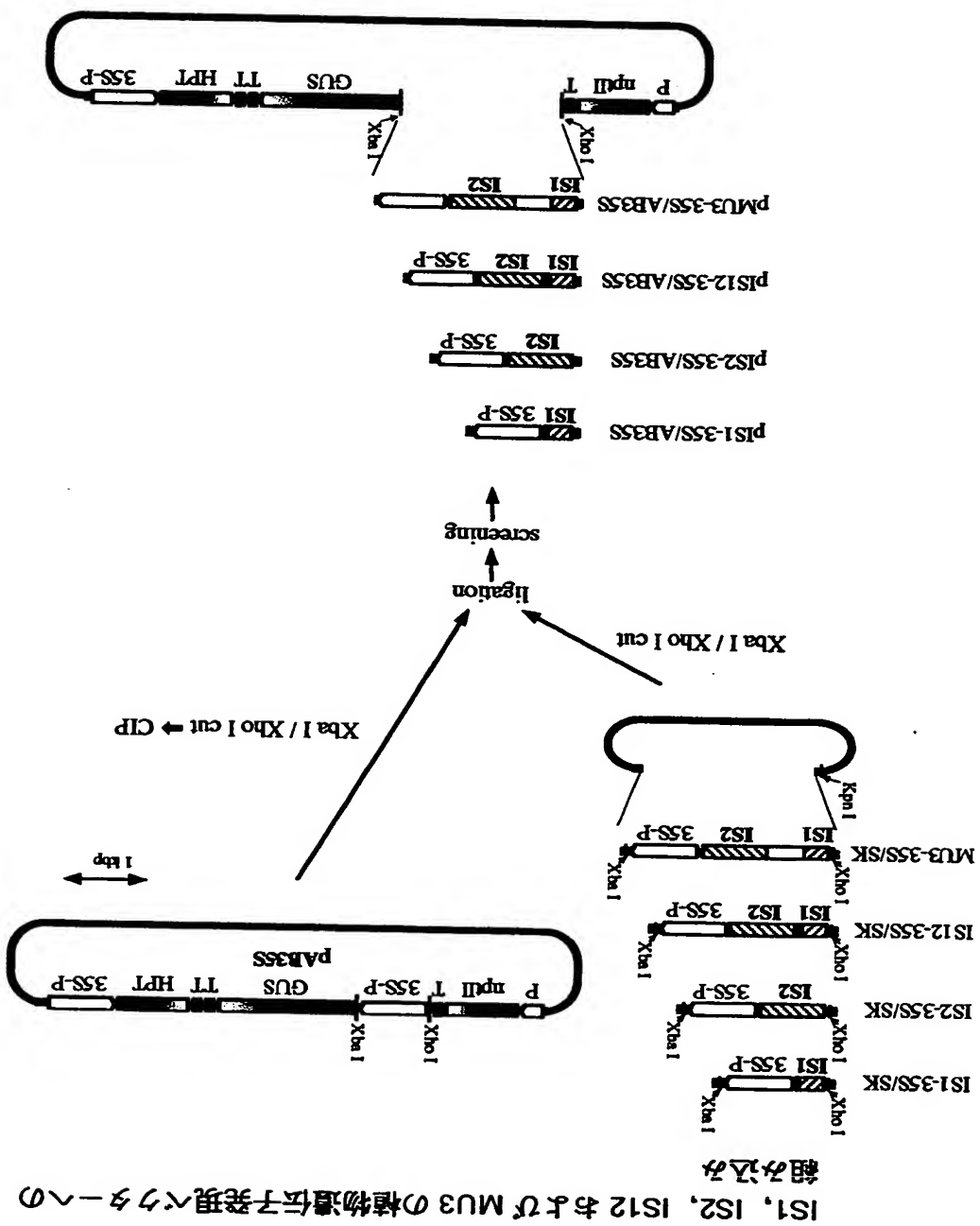
IS12 のクローニング



【図 10】

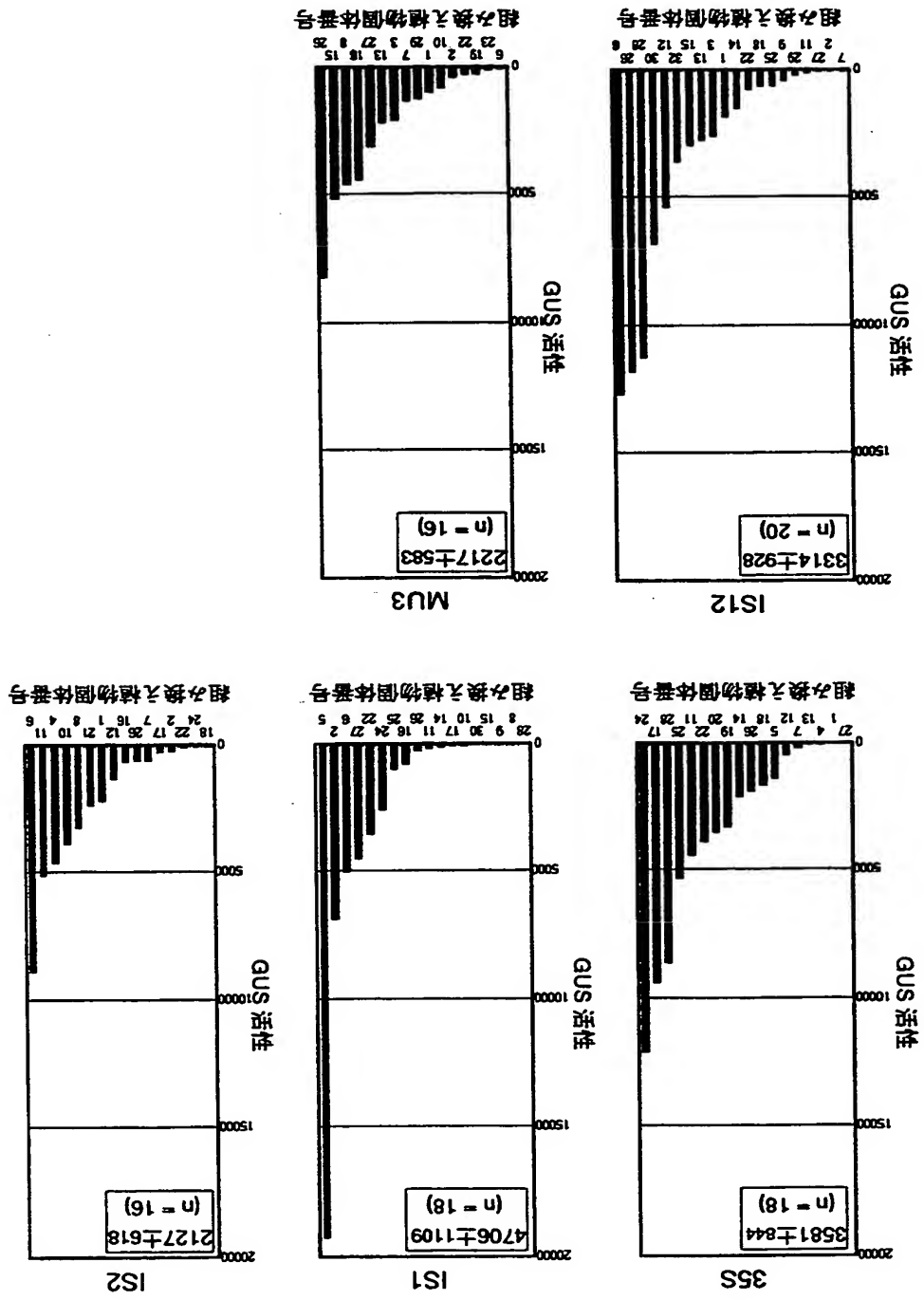


【図 11】

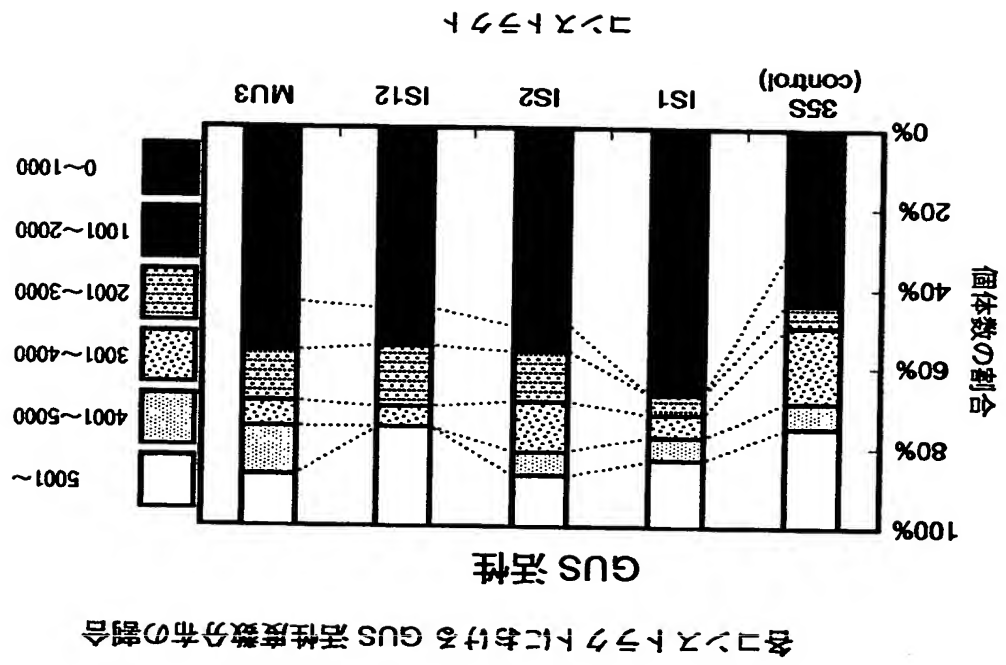


【図 12】

各コンストラクトにおける形質転換タバコ個体ごとの GUS 活性



【図 13】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】ジーン・サイレンシング等による遺伝子発現の不活性化を抑制する（遺

伝）因子の提供。

【解決手段】1以上の可動性因子、特にMITE様因子を含むジーンサイレンシ

ング抑制因子。下記（a）又は（b）のDNA：（a）配列番号1の塩基配列か

らなるDNA、（b）（a）の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条

件でハイブリダイズし、かつ挿入部位において（A）n G（A）n [nは1以上

の整数]の重複を引き起こすMITE様因子をコードするDNA、及び/又は、

下記（c）又は（d）のDNA：（c）配列番号2の塩基配列からなるDNA、

（d）（c）の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

イズし、かつ挿入部位においてTAの重複を引き起こすMITE様因子をコード

するDNAを有するジーンサイレンシング抑制因子。

【選択図】なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000175283]

1. 変更年月日 1992年10月30日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府豊中市三和町1丁目1番11号  
氏 名 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[599101760]

1. 変更年月日

1999年 7月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都東久留米市大門町2-3-6-302

氏 名

小関 良宏